

ANTI-C5A RECEPTOR ANTIBODY, ITS PRODUCTION AND USE

Patent Number: JP8109200
Publication date: 1996-04-30
Inventor(s): IIDA KYOKO; IWANE OSAMU; INUZUKA HIROYUKI
Applicant(s): TAKEDA CHEM IND LTD
Requested Patent: ☐ JP8109200
Application Number: JP19950166731 19950703
Priority Number(s):
IPC Classification: C07K16/28; C12N5/10; C12N15/02; C12P21/08; G01N33/577
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

PURPOSE: To obtain the subject new antibody inhibiting the combination of a C5a receptor to a ligand, not neutralizing a biological activity produced by the combination of the ligand, useful for measuring the receptor of a complement ingredient having a biophylaxis function, etc., and used for researches, etc.

CONSTITUTION: The new anti-C5a receptor monoclonal antibody inhibiting the combination of the C5a receptor to the ligand but does not neutralizing a biological activity produced by the combination of the ligand. The anti-C5a receptor antibody is useful for the method for immunologically measuring the receptor of the complement ingredient C5a having a biophylaxis function, and extremely useful on the research of the action of the C5a on various diseases and on the research of the progress on the expression of the C5a receptor. The antibody is obtained by binding a polypeptide having the No. 1-20 amino acid sequence at the N-terminal of the C5a receptor to a carrier protein, administering the obtained hapten in a mouse, collecting the cells of the spleen after finally immunized, fusing the collected splenic cells to myeloma cells, selecting a specific antibody-producing strain, cloning the strain, and subsequently culturing the obtained hybridoma.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-109200

(43) 公開日 平成 8 年 (1996) 4 月 30 日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 16/28	Z N A	8318-4H		
C 1 2 N 5/10				
15/02				
		7729-4B	C 1 2 N 5/ 00	B
		9281-4B	15/ 00	C
審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 9 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号	特願平7-166731	(71) 出願人	000002934 武田薬品工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
(22) 出願日	平成7年(1995)7月3日	(72) 発明者	飯田 恭子 大阪府大阪市都島区友淵町1丁目5番5-1610号
(31) 優先権主張番号	特願平6-195624	(72) 発明者	岩根 理 兵庫県宝塚市口谷西3丁目58-3 ダイア パレス宝塚701号
(32) 優先日	平6(1994)8月19日	(72) 発明者	犬塚 弘幸 大阪府池田市五月丘5丁目1番3号 武田 薬品五月丘寮内
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(74) 代理人	弁理士 朝日奈 忠夫 (外2名)

(54) 【発明の名称】 抗C5aレセプター抗体、その製造法および用途

(57) 【要約】

【目的】 ヒトC5aレセプターの免疫学的測定法において有用な抗C5aレセプターモノクローナル抗体を提供する。

【構成】 C5aレセプターのリガンドとの結合を阻害するが、リガンド結合により生じる生物活性を中和しない抗C5aレセプターモノクローナル抗体、該抗体を産生するハイブリドーマ、該抗体を免疫学的に反応させることを特徴とするC5aレセプターの測定法。

【効果】 本発明抗体は、C5aレセプターとリガンドとの結合を阻害するが、リガンド結合により生じる生物活性を中和しないことから、各種疾病におけるC5aの働き、あるいはC5aレセプターの発現の推移を探るうえで、極めて有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】C5aレセプターのリガンドとの結合を阻害するが、リガンド結合により生じる生物活性を中和しない抗C5aレセプターモノクローナル抗体。

【請求項2】認識部位がC5aレセプターのN末端20アミノ酸残基からなる領域に存する請求項1記載の抗体。

【請求項3】モノクローナル抗体MH1/20である請求項1記載の抗体。

【請求項4】C5aレセプターのリガンドとの結合を阻害するが、リガンド結合により生じる生物活性を中和しない抗C5aレセプターモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項5】C5aレセプターのN末端20アミノ酸残基からなるペプチド断片で免疫感作されたマウス脾臓細胞とマウス骨髓腫細胞とを融合してなる請求項4記載のハイブリドーマ。

【請求項6】請求項4記載のハイブリドーマを液体培地または動物腹腔内で培養し、培養上清または腹水より抗体を採取することを特徴とする請求項1記載の抗体の製造法。

【請求項7】マウスハイブリドーマMH1/20である請求項4記載のハイブリドーマ。

【請求項8】C5aレセプターに請求項1記載の抗体を免疫学的に反応させることを特徴とするC5aレセプターの測定法。

【請求項9】フローサイトメトリ法である請求項8記載の測定法。

【請求項10】請求項1記載の抗体を含有するC5aレセプター測定用試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、細胞上に発現されているヒトC5aレセプターの免疫学的測定法およびその測定に用いるモノクローナル抗体、さらにはそのモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマに関する。

【0002】

【従来の技術】生体には病原微生物その他の異物の侵入を阻止する防御機能として、抗体や感作リンパ球の関与する特異的防御機能と免疫の関与しない非特異的防御がある。非特異的防御機能として重要なものに補体がある。補体系は9つの蛋白質（詳しくは約20種）から成り、それぞれの成分は肝細胞やマクロファージによって作られ、正常な状態では体液中に不活性状態で個別に存在するが、抗原抗体複合体、細菌細胞壁その他により活性化され、生体防御因子として機能する。補体系の活性化が起こると、体液中の補体系タンパクが酵素分解され、種々の生物活性を有する断片が産生される。これらの補体タンパク断片のうち、C3a、C4a、C5aの3つは、アナフィラトキシンと総称され、アナフィラキ

シーショックを含む様々な炎症反応を引き起こす化学媒体である。またこれらは、免疫調節物質としての作用も有していることが明らかにされている。これら3つのアナフィラトキシンのうち最も強い炎症作用を引き起こす物質であるC5aは、補体第5成分C5が、C5転換酵素によって切断され産生される2断片のうち小さい方の断片すなわち、C5α鎖のN末端74個のアミノ酸残基から構成される分子量11,000の糖タンパク質である。C5aは、白血球遊走作用、血管透過性亢進作用、平滑筋収縮作用を持ち、単球に作用してサイトカインを産生させることにより免疫反応を調節する作用も有する。このため、敗血症、成人呼吸窮迫症候群、喘息、粥状動脈硬化症、心筋梗塞、脳梗塞等の虚血性疾患、乾せん、腎炎、さらには外傷や火傷など致死率の高い多くの疾患の原因物質となっている。

【0003】C5aがこれらの生物活性を現すには、その特異的レセプター、C5aレセプター（C5aR）に結合して細胞内に情報刺激が伝達される必要がある。ミエロイド細胞株HL60およびU937のcDNAから遺伝子クローニングがなされた結果、C5aRは350個のアミノ酸残基より構成される糖タンパク質で、7回膜貫通型の構造を有しており、細胞内のGタンパクと結合してその細胞内情報伝達を行うロドプシンレセプターの一員であることが明らかになっている（Gerard, N. P. および Gerard, C., ネイチャー（Nature）第349巻：614頁, (1991); Boulay, F. ら バイオケミストリー（Biochemistry）第30巻：2993頁, 1991）。C5aRを特異的に認識する抗体は、モノクローナル抗体（Oppermann, M. ら, ジャーナル オブ イムノロジー（The Journal of Immunology）第151巻：3794頁, 1993）およびポリクローナル抗体（Morgan, E. L. ら, 同誌 377頁）のいずれも1993年になって、はじめて作製された。Oppermann らによって作製されたモノクローナル抗体S5/1は、C5aRのN末端1番目から31番目までのアミノ酸配列を有するペプチドを牛アルブミンに結合させたタンパク質を免疫原として作製された。この抗体は、C5aRとリガンドC5aとの結合を競合的に阻害しリガンド結合によっておこる好中球の生物活性を中和するので、レセプターのN末端より数えて15番目から21番目のアミノ酸配列の部位を認識している。

【0004】これらの抗体は、リガンドの結合を阻害し、またレセプターの細胞表面での発現を蛍光抗体をもちいてFACS解析をすることを可能にした。その結果、好中球、好酸球、単球上にC5aRが発現していることが明らかになった。しかしリガンドと競合阻害する故にいくつかの不利な点があった。すなわち血小板上にC5aRが存在するのかどうかは、モルモットの場合には、発現が証明されているもののヒトでは、議論の分かれるところである。中和抗体S5/1は、リガンドの結合部位と同じ部位に結合するため、少しの刺激で簡単に

活性化されてしまう血小板を扱う実験には、使用できない。そのためヒト血小板上のC5aR発現については、いまだに結論が得られていない。さらに、細胞上のC5aR発現量は、疾病などにより変化があるものと予想される。現存する中和抗体では、高感度なC5aRの定量化には、誰も成功していないのが現状である。さらにC5aRとリガンドとの結合には、1カ所だけではなくいくつかの部位の相互作用が関与しているといわれている。最近では、N末端以外にも細胞膜貫通部分によって取り囲まれた、芯(core)とよばれる部分も結合に関与しているという事実が示された(Siciliano, S.J.ら, プロシーディングス オブ ナショナル アカデミーオブサイエンス(PNAS)第91巻:1214頁, 1994年。N末端15から21番の配列をもつペプチドを認識するモノクローナル抗体が、C5aRとそのリガンドC5aとの結合を阻害し、リガンド結合によってもたらされる細胞の生物活性を阻止することが明らかにされているが、これと異なるペプチドを免疫原としてモノクローナル抗体を得、これがC5aとレセプターとの結合を阻害するかどうか、またC5a結合によって惹起される細胞の生物活性を阻止するかを調べることによって、リガンド結合部位の詳細な構造を解析し、レセプターによるシグナル伝達方法を明らかにしていく必要がある。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】炎症が起こったとき好中球などの多核白血球は細胞表面上のC5aRの発現を増やし、炎症部位への遊走を速め、また血管外への透過を亢進さらには、顆粒の放出等による生体防御をすると想像が出来る。これらの多核白血球に加え血小板は、刺激を受けて多くの生物活性を持つ分子を含む大量の顆粒を放出し、刺激からの生体反応としては、もっとも迅速な応答を行っている。そしてその結果血小板自身は、凝集をおこし死に至る。しかしC5aRの定量化が、可能にされていない現状では、C5aの刺激を受けた細胞がこのような現象をおこしているということは、想像の域を越えることは無い。C5aRが正確に定量出来るようになれば、疾患の経過を知り、病因および病態の解明のために非常に有用な情報を与えることはまちがいない。一方、リガンド結合部位を認識する抗体は、多くの場合レセプターに結合することによってリガンドと同じ効果、すなわちレセプターを介したシグナルを与えてしまう。この結果細胞が活性化され、細胞凝集、レセプターの内在化ひいては、細胞死に至ることにもなる。従って抗体の結合による細胞の活性化を引き起こさない抗体を用いての、レセプターの定量が望まれる。また上述したように、C5aR上のリガンド結合部位を特定し、複雑なリガンド結合に続くレセプター構造変化、さらにはシグナル伝達方法を明らかにしていくためにも現存する中和抗体以外のモノクローナル抗体の使用が望まれる。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記事情を鑑み研究した結果、C5aRのN末端1番より20番のアミノ酸よりなるポリペプチドをキャリアー蛋白キーホール リンペットヘモシアニン(KLH)とコンジュゲートしたKLH-C5aR₁₋₂₀を免疫原としてモノクローナル抗体を作成し、これを用いて細胞上に発現されているC5aRを安定に定量することを可能にした。この知見に基づき、さらに鋭意研究し、本発明を完成した。即ち本発明は、(1)C5aレセプターのリガンドとの結合を阻害するが、リガンド結合により生じる生物活性を中和しない抗C5aレセプターモノクローナル抗体、(2)認識部位がC5aレセプターのN末端20アミノ酸残基からなる領域に存する上記(1)記載の抗体、(3)モノクローナル抗体MH1/20である上記(1)記載の抗体、(4)C5aレセプターのリガンドとの結合を阻害するが、リガンド結合により生じる生物活性を中和しない抗C5aレセプターモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、(5)C5aレセプターのN末端20アミノ酸残基からなるペプチド断片で免疫感作されたマウス脾臓細胞とマウス骨髓腫細胞とを融合してなる上記(4)記載のハイブリドーマ、(6)上記(4)記載のハイブリドーマを液体培地または動物腹腔内で培養し、培養上清または腹水より抗体を採取することを特徴とする上記(1)記載の抗体の製造法、(7)マウスハイブリドーマMH1/20である上記(4)記載のハイブリドーマ、(8)C5aレセプターに上記(1)記載の抗体を免疫学的に反応させることを特徴とするC5aレセプターの測定法、(9)フローサイトメトリー法である上記(8)記載の測定法および(10)上記(1)記載の抗体を含有するC5aレセプター測定用試薬に関するものである。

【0007】本発明の抗C5aRモノクローナル抗体(mAb)は、公知の遺伝子工学的手法によっても作成できるが、通常、ハイブリドーマ法によって作成される。該抗体産生ハイブリドーマの作製は常法に従って実施される。すなわち、C5aRまたはその部分ポリペプチドキャリアーコンジュゲートあるいは、C5aR発現細胞を動物に免疫し、抗体産生を確認する。ここで、免疫原としては、C5aR部分ポリペプチド、特にN末端20アミノ酸残基からなる部分ポリペプチドのキャリアーとのコンジュゲートを用いることが好ましいが、目的の抗体が得られる限り、特にこれに限定されない。次に免疫動物より採取した抗体産生細胞、例えば脾臓細胞やリンパ節細胞などを骨髓腫細胞(例、マウスの場合、NS-1、P3U1、Sp2/0)と融合し、得られたハイブリドーマの中からC5aR部分配列ポリペプチドコンジュゲートに特異的に結合し、C5aR発現細胞に結合可能な抗体を産生する細胞をスクリーニングする。本発明において抗原として用いるC5aレセプターフラグメントペプチドキャリアー蛋白結合体は、通常の方法に

よって作成される。すなわち(1)キャリアー蛋白溶液(1mg/mlないし20mg/mlの濃度に調製しpH7ないし8のもの)と(2)m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシニドエステル(3mg/mlの濃度ジメチルホルマミド中に調製したもの)(3)抗原ペプチド溶液(1mg/mlから10mg/mlの濃度に調製したもの)を用意し、蛋白溶液(1)に(2)をゆっくり加える。室温にて30分攪拌後、ゲルろ過カラムにて蛋白画分を集めこれを(3)のペプチド溶液に加え、室温でさらに3時間反応させる。この方法以外にたとえばグルタルアルデヒドによる重合法でもペプチド蛋白結合体を作ることが出来る。

【0008】免疫動物としては、例えばウサギ、ラット、マウス、ハムスター、モルモット等が用いられるが、マウスが特に好ましくもちいられる。接種方法としては、通常実施される方法に従えばよく、例えばC5aR部分配列ポリペプチドコンジュゲートの場合、マウスに1回0.05-30 μ g、好ましくは0.1-5 μ g、C5aR発現細胞の場合、マウスに1回10⁵-10⁷細胞数を、等容量の生理食塩水及びフロイントの完全アジュバントで乳化して、背部、腹部の皮下あるいは腹腔内に2-3週毎に3-6回接種する方法が採られる。これらの免疫動物、例えばマウスから抗体価の高い個体を選択し、最終免疫3-5日後に脾臓及び/あるいは、リンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させる。融合操作は既知の方法に従って実施できるが、融合促進剤としては、ポリエチレングリコール(PEG)やセンダイウイルスなどが挙げられ、好ましくはPEGが常用される。骨髓腫細胞としては、NS-1、P3U1、Sp2/0などが挙げられ、特にP3U1が好ましく用いられる。脾臓細胞と骨髓腫細胞との好ましい比率は1:1-10:1で、これに平均分子量約1000-8000のPEGが、10-80%の濃度で添加され、20-37℃で3-10分間反応するのがよい。

【0009】抗C5aRmAb産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できる。例えば、マイクロプレート上にC5aRまたは免疫を用いたC5aR部分ポリペプチドとBSA(牛血清アルブミン)のコンジュゲート(例えば、BSA-C5aR₁₋₂₀)を常法に従って固定化し、抗原感作プレートを作成する。次いでハイブリドーマ培養上清をこの抗原感作プレートに添加し、プレート上に結合した抗C5aR抗体を検出する、酵素免疫測定法(ELISA)により培養上清中の抗体価を測定する。HAT(ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン)添加培地で選別、育種された抗体活性陽性のハイブリドーマは直ちにクローニングに供されるが、通常このクローニング操作は限界希釈法などで容易に実施される。クローン化されたハイブリドーマの培養上清を上記のELISAに供し、抗体活性陽性示すも

のうちの、C5aR発現細胞(例えば好中球など)に結合し蛍光標識二次抗体を用いて検出される抗体産生ハイブリドーマを選別し、目的とする抗C5aモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを取得する事が出来る。以上のような製造法に従って作成した抗C5aRmAb産生ハイブリドーマの例として、後述の実施例1-(3)に示すハイブリドーマMH1/20が挙げられる。上記した本発明のハイブリドーマの培養は通常、液体培地中または動物腹腔内(例えば、マウスなど哺乳類を使用)で公知の方法により実施出来る。培養液および腹水液中の抗体の精製についても公知の生化学的手法を組み合わせで実施出来る。例えば、細胞培養液あるいは腹水を遠心分離後、塩析(通常硫酸アンモニウムもしくは硫酸ナトリウムを使用)し、得られた蛋白沈澱物を適当な溶液に溶解し透析する。次いでカラムクロマトグラフィー(イオン交換カラム、ゲル濾過カラム、プロテインAカラム、プロテインGカラム、ヒドロキシアパタイトカラムなど)に供し、目的とする抗体を分離精製出来る。以上のような分離精製操作により、例えば蛋白質として90%以上の純度のmAbを、1Lの細胞培養上清から約5-20mg、20mlの腹水液からは約20-100mg得られる。

【0010】以上のようにして得られたmAbはタンパク質として均一であり、蛋白分解酵素処理などにより、C5aRに対する結合能を保持したままF(a b')₂やFab断片などを調製でき、これらは本発明のmAb全IgG分子と同様の目的に用いられるものであり、本発明でいう「抗ヒトC5aRモノクローナル抗体」に含まれる。またこれらのハイブリドーマがマウスIgGmAbを産生する場合には、該抗C5aRmAbの抗原認識部位をふくむ可変領域あるいは超可変領域をコードするDNAを取得し、これに遺伝子操作技術(Z. Stepieleskiら、プロシーディングス オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.), 第85巻:4852頁、1988;L.Reichmannら、ネイチャー(Nature), 第332巻:323頁、1988)を用いてヒトIgGの定常領域あるいは/および可変領域フレームワークをコードする遺伝子を結合させ、マウス-ヒト・キメラ抗体あるいはヒト型抗体を作成する事もできる。

【0011】上記により得られた本発明精製抗体は、放射性同位元素、酵素、発光物質、蛍光色素等で常法に従って標識化されて各種の免疫測定法に試薬として用いられる。放射性同位元素としては、たとえば¹²⁵I、¹³¹I、³H、¹⁴Cなどが、酵素としては、安定で比活性が大きなものが好ましく、例えば、(1)カルボヒドラーゼ(例、グリコシダーゼ(例、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グリコシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、 β -フルクトシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、 α -グルコシダーゼ、 α -マンノシダーゼ、アミラーゼ(例、 α -アミ

ラーゼ、 β -アミラーゼ、イソアミラーゼ、グルコアミラーゼ、タカアミラーゼA)、セルラーゼ、リゾチーム)、(2)アミラーゼ(例、ウレアーゼ、アスパラギナーゼ)、(3)エステラーゼ(例、コリンエステラーゼ(例、アセチルコリンエステラーゼ)、ホスファターゼ(例、アルカリホスファターゼ)、スルファターゼ、リパーゼ)、(4)ヌクレアーゼ(例、デオキシリボヌクレアーゼ、リボヌクレアーゼ)、(5)鉄・ポルフィリン酵素(例、カタラーゼ、ペルオキシダーゼ、チトクロームオキシターゼ)、(6)銅酵素(例、チロシナーゼ、アスコルビン酸オキシターゼ)、(7)脱水素酵素(例、アルコール脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素、乳酸脱水素酵素、イソクエン酸脱水素酵素)などが、発光物質としてはルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどがそれぞれ挙げられる。蛍光色素としては、フルオレセイン、ローダミン、フィコエリスリン、フルオレスカミン、フルオレッセンスイソチオシアネートなどが挙げられる。上記の標識試薬のなかでも、蛍光試薬がより好ましく用いられる。以下に細胞上に発現されているヒトC5aRの本発明抗体を用いた免疫学的測定法の操作について具体的に説明するが、これに限定されるものでないことは言うまでもない。

【0012】1) 間接染色法

$10^5 - 10^6$ 個の細胞を遠心分離によって細胞ペレットとし、これに0.01%アジ化ナトリウムと1%BSAあるいは、1%FCSを含む適当な緩衝液で希釈したmAbを $20 \mu\text{l}$ 添加する。該抗体の濃度は $1 - 100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは、 $5 - 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ である。緩衝液はハンクスバランスドソルトソリューション(HBSS)あるいは、RPMI 1640などの培地等が用いられる。細胞のかわりに血小板を用いるときは、これらの緩衝液に10%の容量の日局クエン酸ナトリウムの3.8%水溶液を加える。細胞と抗体との反応は、約 $0^\circ\text{C} - 30^\circ\text{C}$ にて20分~1時間行う。反応終了後、反応液に抗体希釈に用いた緩衝液を 1ml 加え遠心分離する。遠心上清を取り除き、細胞ペレットに標識したF(ab')₂抗マウスIgG抗体を適当に希釈して $20 \mu\text{l}$ 加える。該標識抗体の濃度は、標識の強さあるいは、抗体価によってことなるが、通常 $0.1 - 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ で用いられる。同様の反応条件で20分から1時間反応させた後緩衝液を加えて洗浄する。標識抗体により標識された細胞などは適当な解析装置を用いて測定すればよい。例えば、蛍光染色された細胞あるいは、血小板などはFACS Starなどの解析装置にて解析する。

2) 直接染色法

1)の方法の第1段階に反応させる抗C5aR抗体を蛍光色素などの標識剤で標識しておく方法であり、反応は1段階のみである。希釈液、反応時間、などの条件は、1)の方法と同じである。

【0013】以下に実施例を挙げて本発明をさらに具体

的に説明するが、これらが本発明の範囲を制限するものでないことは言うまでもない。なお、実施例で得られたハイブリドーマMH1/20は、平成6年8月5日より財団法人発酵生物研究所(IFO)に受託番号IFO50443として、また、平成6年8月23日より通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(NIBH)に、受託番号FERM BP-4784として寄託されている。

実施例1 マウス抗C5aRmAb産生ハイブリドーマの作製

(1)免疫

C5aRN末端1-20番目の配列($\text{NH}_2 - \text{MNSFNYTTPDYGHYDDKDTL} - \text{COOH}$)〔配列番号1〕をもつポリペプチドをキャリアー蛋白KLHにコンジュゲートしたKLH-C5aR₁₋₂₀をフロイント完全アジュバントと等量混ぜ合わせて乳化しBALB/cマウスの腹腔内に1回 $5 \mu\text{g}$ 、3週間の間隔を置いて5回免疫した。なお初回以外は、フロイントの不完全アジュバントを用いた。各免疫後2週間目に採血し血中の抗体価を、BSA-C5aR₁₋₂₀(C5aRN末端1-20番目のポリペプチドをキャリアー蛋白BSAにコンジュゲートしたもの)を抗原としたELISAで測定した。すなわちBSA-C5aR₁₋₂₀を $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、各ウエル $50 \mu\text{l}$ ずつコートし、1%BSAを含むPBSでブロックした。そこへ、希釈した免疫マウス血清を $50 \mu\text{l}$ ずつ加え、 37°C で1時間反応させた。ウエルを0.01%Tween 20を含むPBSでよく洗った後、西洋ワサビパーオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgG抗体を添加し1時間反応させた。洗浄後、酵素基質としてo-フェニレンジアミンおよび H_2O_2 を含む0.1Mクエン酸緩衝液(pH4.5)を加えて室温で酵素反応を実施した。1N硫酸で反応を停止後、 490nm の吸光度を測定した。5回目の免疫で抗体価が最高値を示した個体について、さらにKLH-C5aR₁₋₂₀溶液を静脈内投与した。

【0014】(2)細胞融合

最終免疫後3日で脾臓を摘出し、脾臓細胞懸濁液を常法により調製した(約 10^8 個)。次いでマウス骨髓腫細胞P3U1(2×10^7 個)を添加し、ポリエチレングリコールPEG6000をもちいて融合した(ケーラーとミルスタインネイチャー(Nature)第256巻:495頁,1975年)。融合終了後、細胞混液をヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む、いわゆるHAT培地中に懸濁し10日間培養した。以後は親細胞株の選択除去が終了次第HAT培地からアミノプテリンを除いたHT培地に変え培養を続けた。

(3)ハイブリドーマの選択およびクローニング

融合10-20日後にハイブリドーマの出現を認めたので、(1)で記述したBSA-C5aR₁₋₂₀を抗原とするELISAにより、ハイブリドーマ培養上清中の抗体

価を測定した。強い抗体活性を示したハイブリドーマについては、限界希釈法によるクローニングを行った。これらのハイブリドーマにつき末梢血から分離した好中球への抗体結合をフローサイトメトリー解析で検定を行った。すなわち好中球にハイブリドーマ培養上清を加え、0℃30分間反応させた。次いで、1回洗浄後、2次抗体としてFITC標識ヤギ抗マウスIgG抗体と反応させた。30分反応後FACSstar（ベクトンディキンソン社）に供した。MH1/20抗体のみが好中球に結合した。MH1/20抗体は、IgG1, κ サブクラスであることをサブクラス確認キットで決定した。

(4) MH1/20抗体の精製

予め0.5ml鉱油を腹腔内投与したBALB/cマウスに、ハイブリドーマ細胞MH1/20 2×10^6 個を腹腔内投与した。約10-15日後に腹水を採取しプロテインGを用いるアフィニティクロマトグラフィーにより常法通りMH1/20抗体を精製した。

【0015】実施例2 C5a惹起好中球活性化阻止試験

(1) P39 (+) 細胞の分化

P39 (+) 細胞は、骨髓腫患者の細胞より樹立されたミエロイド細胞株P39細胞から補体第3成分(C3)を結合し凝集能をもつサブラインとして樹立された細胞株である(Matsumoto, M. ら, ヨーロピアン ジャーナル オブ イムノロジー (Eur. J. Immunol.) 第21巻: 1787頁, 1991年)。この細胞は、ジブチリル cAMP を添加して培養すると細胞質内に顆粒をもち多型核化して好中球様の細胞に分化する。分化の指標の1つとしてC5aRの発現があり、分化した細胞にC5aを添加すると反応液中に顆粒を放出する。従って顆粒中の酵素の1つN-アセチル-D-グルコサミニダーゼを定量する事によって分化の度合いを調べることができる。この原理を用いP39 (+) 細胞の分化を観察した。その方法は次のとおりである。分化した細胞を2回洗浄した後 10^7 /ml HBSS に調製し終濃度 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ のCytochalasin Bで15分間反応させた。この細胞懸濁液 $100 \mu\text{l}$ に希釈したC5a $100 \mu\text{l}$ を加え37℃で1時間反応させた。反応混液を1500回転にて10分間遠心し上清 $100 \mu\text{l}$ を96穴プレートに移し、これに基質p-ニトロフェニル-N-アセチル- β -D-グルコサミドを50mM クエン酸緩衝液(pH4.5)中で1時間反応し0.4Mグリシン緩衝液(pH10.5)を添加して反応を停止、405nmで吸光度を測定した。この結果は〔図1〕に示すとおりP39 (+) 細胞(●)は、2日間で分化しその後は、急速に細胞死に到った。なお、対照としてジブチルcAMP非測定(□)およびC5a非添加(○)P39 (+) 細胞の酵素活性を同様の方法で測定した。

(2) 抗体によるC5aRの機能阻害試験

上記実施例1-(1)で示したP39 (+) 細胞分化の

条件すなわち0.5mM ジブチリルcAMP 中で2日間分化させた細胞をもちいて0.1, 0.3, 1および3nMのC5a刺激による酵素の放出を同様の方法で測定した。このときMH1/20抗体($20 \mu\text{g}/\text{ml}$)が存在しても放出される酵素の量には殆ど差は見られなかった〔図2〕。なお、図中、□は抗体共存下の酵素量を○は抗体非存在下(対照)の酵素量を示す。

【0016】実施例3 C5a結合阻害活性試験

C5aのC5aRへの結合は、 ^{125}I -C5aを用い、好中球、単球、あるいは、株化した細胞などへの結合を30分から1時間反応させ、未結合分を遠心分離で除いた後、放射活性を測定することによって定量できる。この結合を阻害する物質を探索する場合などは、多くのサンプルを同時に定量する必要があるが、こういう場合には、細胞膜を調製し、 ^{125}I -C5aの膜への結合を調べる方法を用いることができる。

(1) 膜画分の調製

分化P39 (+) 細胞をHBSSで洗浄し、0.25M ショ糖, 0.04M NaCl, 0.1M KCl, 0.005M MgCl_2 , 0.02Mトリス塩酸緩衝液(pH7.6)にインヒビターカクテル{ $10 \mu\text{M}$ ロイペプチン, $10 \mu\text{M}$ ペプスタチン, $50 \mu\text{M}$ オ-フェナンスロリン, 100KIU アプロチニン, $100 \mu\text{M}$ p-アミジノフェニル-メタンスルホニル フルオリド塩酸(p-APMSF)}を加えたものに懸濁した。テフロンホモゲナイザーに細胞懸濁液をいれて、氷上10-40ストローク破碎を行う。顕微鏡で細胞膜が破碎され、核膜は保持されているのを確認した。3000回転10分間遠心し、核及び破碎されなかった細胞を除き、上清に5mM EDTAを加えて、100,000回転20分間遠心して得られた沈澱をPBSに上記のインヒビターカクテルと5mMEDTAを加えた溶液に懸濁し、これを膜画分として用いた。

(2) C5a結合試験

上記(1)で調製した膜画分 10^6 個細胞相当に ^{125}I -C5a($10,000 \text{cpm}$)を加え、氷上60分間反応後、グラスフィルター(Whatmann GF/B)上で吸引濾過し3回洗浄した。フィルターにトラップされた放射活性を測定した。この結合反応の特異性を示すため、放射ラベルしていないコールドC5aを量を変化させて反応系に加えたところコールドC5aの濃度依存性の結合阻害がみられ、結合がレセプター/リガンド特異的に起こっていることが示された〔図3〕。この反応系にモノクローナル抗体MH1/20を加えた時、抗体濃度依存的に ^{125}I -C5a結合阻害がみられた〔図4〕。上記実施例(2)において、MH1/20がC5a惹起P39 (+) 細胞の機能阻害はしないことと合わせ、C5aRとC5aの結合様式が2箇所以上であることを示している。

【0017】実施例4 フローサイトメトリー

(1) 多核白血球細胞

末梢血から分離した好中球、および分化P39(+)細胞についてMH1/20抗体の結合をフローサイトメトリ解析によって定量した。10⁶個の細胞をFITC標識したMH1/20抗体(20μg/ml)と0.01%アジ化ナトリウム、1%FCSの存在下氷上で30分間反応させた。同緩衝液で1回洗浄しFACSstarに供した。結果は、〔図5〕～〔図7〕に示すとおり、好中球〔図5〕P39(+)〔図6〕ともにほとんどすべての細胞が強く染色されておりC5aRを大量に発現していることが分かる。一方、未分化のP39(+)は、全くMH1/20抗体を結合していなかった〔図7〕。なお、図中点線は、MH1/20抗体、直線は対照であるOKT3抗体との反応を示す。

(2) 血小板および巨核芽球細胞MEG01

1. 血小板の分離

血小板は、わずかな刺激で簡単に活性化され凝集してしまうため、次のような方法で分離できるだけ活性化を抑えた。すなわち10%容量のチトラール(日本薬局方クエンサンナトリウムの3.8%水溶液)中へ静かに採血し、ただちに3000回転で遠心した。3000回転到達後5秒間で遠心を止め、上清を血小板濃縮血漿(PRP)として用いた。ここで血小板を洗浄する必要があるときは、5mM EDTAを含むTyrode緩衝液を用い、9000回転2秒間の遠心を行った。

2. 血小板へのMH1/20抗体の結合

血小板上には、C5aRが発現していても少数であると予想できるので、(1)でもちいた直接染色法ではなく間接染色法を用いて、コントロール抗体によるバックグラウンドをより正確に比較した。すなわちPRP100μlにMH1/20抗体あるいはコントロール抗体としてT細胞とのみ反応するOKT3抗体(ATCC CRL8001細胞培養上清より取得)を10μl加え、氷上30分間反応させた。5mM EDTAを含むTyrode緩衝液1mlを加えて、9000回転到達後2秒間遠心した。上清を除きペレットに2次抗体FITC標識*

配列:

Met Asn Ser Phe Asn Tyr Thr Thr Pro Asp Tyr Gly His Tyr Asp Asp

1 5 10 15

Lys Asp Tyr Leu

20

【図面の簡単な説明】

【図1】は、ミエロイド細胞P39(+)の分化を示す。

【図2】は、抗体共存時の分化P39(+)細胞のC5a刺激によるN-アセチル-β-D-グルコサミニダーゼ放出反応を示す。

【図3】コールドC5a添加による分化P39(+)細胞膜画分に対する標識C5aの結合阻害を示す。

【図4】MH1/20抗体添加による分化P39(+) 50

*ヤギ抗マウスIgGを加えて、氷上30分間反応させた。この反応混液に1%BSAと5mMEDTAを含むPBSを1ml加えてFACSstarに供した。正常人6名の血小板について調べた結果いずれも有意な抗体結合は見られなかった。コントロールとして、血小板の表面抗原マーカーであるGPIIb/IIIaに対する抗体(ニチレイ)を用いると強い結合がみられた〔図8〕。なお、図中、破線は、GPIIb/IIIa、直線はC5のレセプター点線はOKT3抗原の発現を示す。

10 3. 巨核芽球細胞MEG01の分化とMH1/20抗体の結合性

血小板の前駆細胞とされている巨核芽球細胞株MEG01(IFO50151)は、適当な刺激を与えると分化して血小板様の粒子を放出するようになる。そこで、MEG01に0.5mMジブチリルcAMPを添加して、経時的にMH1/20抗体の結合性を実施例4-

(1)と同じ方法で調べたところ、5日目をピークに抗体結合が見られた。未分化のMEG01にも抗体が結合している細胞が見られた〔図9〕～〔図15〕。図中、直線はMH1/20抗体、点線は対照であるOKT3抗体による染色を示す。

【0018】

【発明の効果】本発明抗体は、C5aレセプターのリガンドとの結合を阻害するが、リガンド結合により生じる生物活性を中和しないことから、各種疾病における、C5aの働き、あるいはC5aレセプターの発現の推移を探るうえで、極めて有用であり、このことは現存の抗C5a抗体を用いた系では結論が得られていなかった血小板上のC5aの存在の有無を本実施例において明瞭に確認していることから明らかである。

【0019】

【配列表】配列番号(SEQ ID NO): 1

配列の長さ(SEQUENCE LENGTH): 20

配列の型(SEQUENCE TYPE): アミノ酸

配列の種類(MOLECULE TYPE): ペプチド

細胞膜画分に対するC5aの結合阻害を示す。

【図5】末梢血中より分離した多核白血球表面でのC5aRの発現の解析。

【図6】分化P39(+)D細胞でのC5aRの発現の解析。

【図7】未分化P39(+)細胞でのC5aRの発現の解析。

【図8】ヒト正常血小板上でのC5aRの発現の解析。

【図9】巨核芽球細胞の分化に伴うC5aRの発現の推

移。ジブチルcAMP添加後(0日)

【図10】巨核芽球細胞の分化に伴うC5aRの発現の推移。ジブチルcAMP添加後(2日)

【図11】巨核芽球細胞の分化に伴うC5aRの発現の推移。ジブチルcAMP添加後(3日)

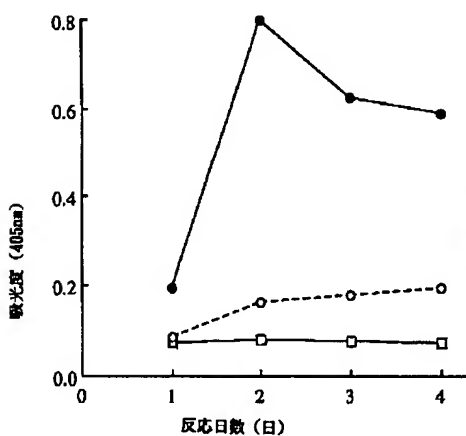
【図12】巨核芽球細胞の分化に伴うC5aRの発現の推移。ジブチルcAMP添加後(4日)

【図13】巨核芽球細胞の分化に伴うC5aRの発現の推移。ジブチルcAMP添加後(5日)

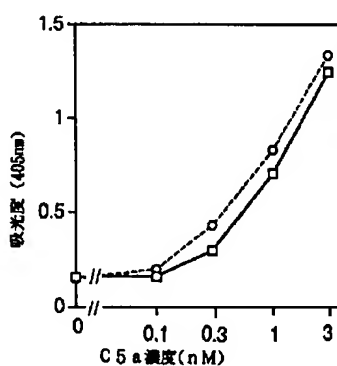
【図14】巨核芽球細胞の分化に伴うC5aRの発現の推移。ジブチルcAMP添加後(7日)

【図15】巨核芽球細胞の分化に伴うC5aRの発現の推移。ジブチルcAMP添加後(9日)

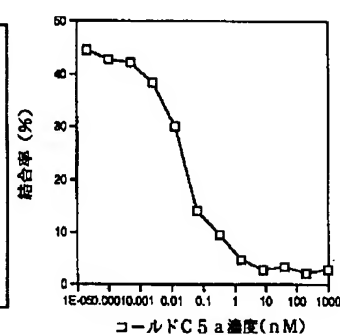
【図1】



【図2】

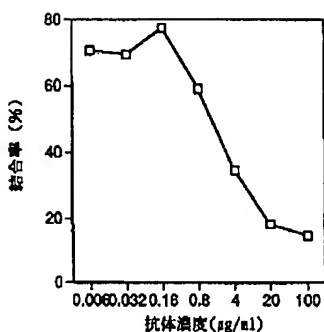


【図3】

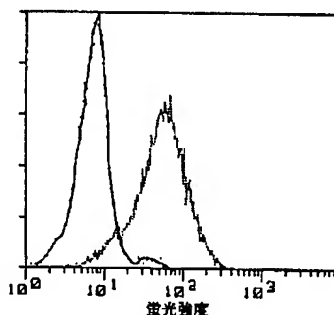
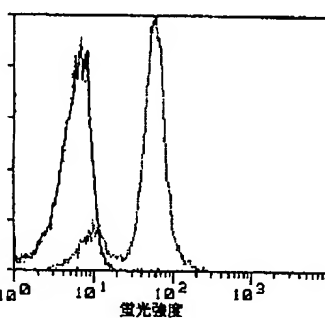


【図6】

【図4】

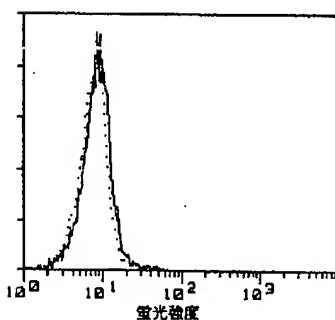


【図5】

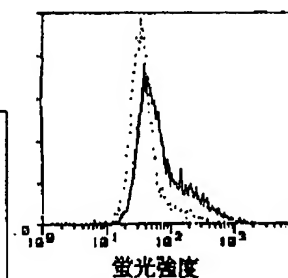
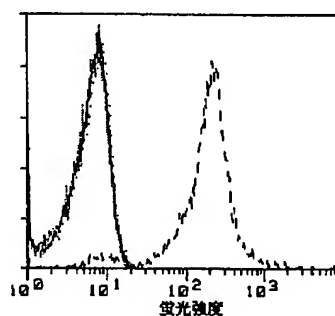


【図9】

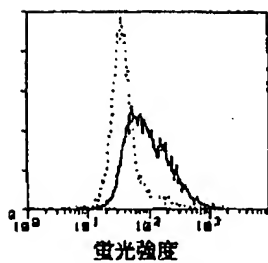
【図7】



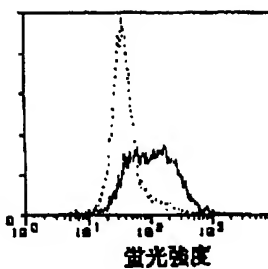
【図8】



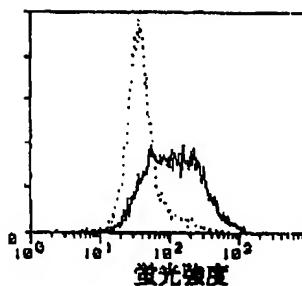
【図10】



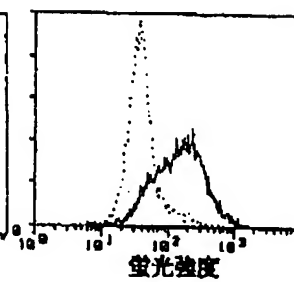
【図11】



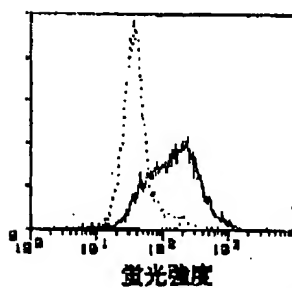
【図12】



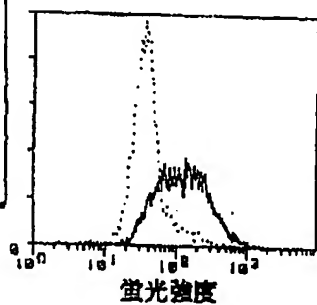
【図13】



【図14】



【図15】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

C12P 21/08

G01N 33/577

// A61K 39/395

(C12P 21/08

C12R 1:91)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

9358-4B

N

THIS PAGE BLANK (USPTO)